

# 新型荧光液池的设计及其在 凋亡细胞核酸检测中的应用

李东辉 陈瑞川

郑 洪 杨黄浩 许金钧

(厦门大学抗癌研究中心, 厦门, 316005) (厦门大学化学系, 国家教委材料与生命开放研究实验室, 厦门, 361005)

**摘 要** 设计并制作了可容纳塑料离心管的新型荧光液池。该液池适用的样品体积变化范围宽(10~50 $\mu$ L), 可用于大批量样品分析, 对生物和临床样品的测定尤为合适。该液池用于凋亡细胞核酸样品的检测, 取得了满意的结果。

**关键词** 荧光 液池 凋亡

## 1 引 言

荧光分析法由于其灵敏度高、选择性好而在生物和临床医学研究与检测中得到广泛应用<sup>[1,2]</sup>。由于生物和临床样品成分复杂, 测定之前常需进行预处理, 离心分离是常用的手段。经离心处理的样品在进行荧光测定时需将样品移入荧光液池, 操作较不方便, 对于大量样品的测定, 这一缺点尤显突出; 生物样品常吸附于液池表面, 在进行下一个样品测定时需要清洗干净, 否则会导致测定误差; 对于需要回收的样品, 测定之后还需将样品移回原离心管中, 使操作步骤增多; 对于微量样品的测定, 则需使用特制微量液池, 其操作更加不便。因此, 实现样品带管检测可使操作步骤大为减少, 并且可避免样品污染。为此, 我们设计了可容纳离心管的新型液池, 并成功地将其应用于凋亡细胞核酸的检测。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

日立 650-10S 荧光分光光度计(日本), 1cm 荧光液池(石英), 微量荧光液池(石英)。

环氧树脂, 固化剂, 0.5mL 及 0.2mL (薄壁型) 塑料离心管, Hoechst 33258、蛋白酶 K、SDS 为 Sigma 公司产品, Tris、RNase A 为 Promega 公司产品。

### 2.2 液池的制作

以 1cm 石英荧光液池为模, 用硬质纸紧密包绕, 将液池抽出, 即制成纸制模型。取一定量的环氧树脂, 加入固化剂, 充分搅拌, 混合均匀。将混合物填入纸模型中, 再将塑料离心管(0.5mL 或 0.2mL) 插入模型, 室温静置使环氧树脂聚合固化。待环氧树脂充分固化变硬后, 在适当位置从侧面将模型镂空, 使离心管底部暴露, 将离心管钳出, 即制成可容纳离心管的液池。

### 2.3 凋亡细胞核酸的提取与检测

按文献方法<sup>[1,2]</sup>消化、收集经药物处理的细胞, 用裂解液(含 20mmol/L Tris - Cl 缓冲液、20mmol/L EDTA、0.5% SDS 及 100 $\mu$ g/mL RNase A, pH8.0) 将其裂解, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 2h, 加蛋白酶 K 至终浓度 200 $\mu$ g/mL, 于 56 $^{\circ}$ C 消化 2h 或在 37 $^{\circ}$ C 下过夜。加等体积 DNA 分级沉淀剂, 混匀后以 10000rpm 离心 1min, 将上清液吸至新管, 沉淀即为未断裂的基因组 DNA。在上清液中再加等体积的乙醇, 在 -20 $^{\circ}$ C 下过夜, 离心收集断裂的 DNA。将其用 75% 乙醇洗涤后, 使用含 0.2~0.4 $\mu$ g/mL Hoechst 33258 的 TE 溶解 DNA, 20min 后, 分别用微量石英液池及自制液池测定溶液荧光, 计算断裂和完整的 DNA 的相对含量, 求出凋亡率。

$$\text{凋亡率} = \left[ \frac{\text{断裂 DNA 相对荧光强度}}{\text{断裂 DNA 相对荧光强度} + \text{未断裂 DNA 相对荧光强度}} \right] \times 100\%$$

### 3 结果与讨论

#### 3.1 液池结构及光路

图1是液池的结构及激发和发射光路。

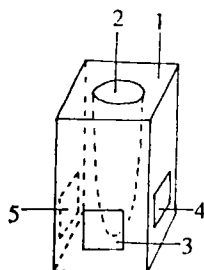


图1 新型液池结构与光路

1. 池体 2. 倒圆锥体状池槽 3. 激发光入射孔  
4、5. 发射光出射孔

根据所用离心管的大小，可制作容纳0.5mL及0.2mL离心管的液池。在实际工作中，我们选择了0.2mL液池。因为0.2mL离心管壁薄，光损耗小（尤其对段波激发光更是如此），离心管之间的光学性质差异小，因而具有较高的测定灵敏度与精密度。另外，采用0.2mL液池，可测定更小体积的样品（10 $\mu$ L）。

#### 3.2 应用

人胃腺癌 MGC 80-3 细胞经姜黄素处理后发生凋亡，凋亡细胞的核酸经提取并用 Hoechst 33258 处理后，分别使用微量石英荧光液池和自制液池测定，计算凋亡率并作浓度相关图。MGC80-3 细胞染色体 DNA 片段转化效率随姜黄素浓度的变化曲线图见图2。

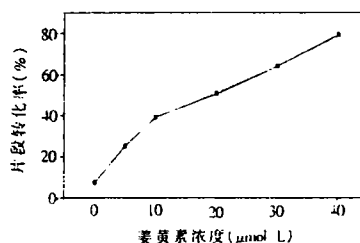


图2 MGC80-3 细胞染色体 DNA 片段

转化效率随姜黄素浓度变化曲线

●用微量石英液池测定的曲线 ■用自制液池测定的曲线

由图2可知，两种液池的测定结果相符合，表明自制液池可用于实际检测。

### 4 结论

新型自制液池具有以下特点：可实现样品的带管直接检测；操作简便，无须洗涤液池；样品间无交叉污染；样品用量少（采用微量液池需用样品量至少350 $\mu$ L，而使用自制液池，样品量可在10~20 $\mu$ L之间选择）；适合于大量样品的连续测定；可用于样品测定后的保存；价格低廉。尽管离心管对短波紫外光有吸收，但由于大多数荧光测定所用的激发与发射波长在可见或近红外区，因此本液池可满足大多数情况下荧光测定的需要。

#### 参考文献

- 1 Haugland R P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 6<sup>th</sup>. Ed., molecular Probes, Inc., Eugene: 1996
- 2 Slavik J. Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology, CRC Press, Inc. Boca Ranton: 1994

收稿日期：1999-10-13

李东辉，男，助理研究员，博士研究生，主要从事荧光分析法在分子生物学和细胞生物学中的应用研究。

**Design of a cuvette for fluorescence spectrophotometer and its application in determination of nucleic acid of dying cells.** Li Donghui, Chen Ruichuan (Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen, 361005), Zheng Hong, Yang Huanghao, Xu Jingou (Department of Chemistry, Key Laboratory of Material and Life Science of MOE, Xiamen University, Xiamen, 361005)

A new cuvette which is able to contain plastic centrifuge tube for fluorescence spectrophotometry is described. It has the merits of simplicity for use and wide range of sample volume (10~500 $\mu$ L), and is suitable for samples with large amount. The con-

tamination can be avoided for biological and clinical samples by using the cuvette. It has been used for the determination of nucleic acid in dying cells satisfactorily.

## Advance Optima 分析系统的新技术

王育良 薛 华

(四川仪表九厂, 重庆, 400060)

**摘 要** 介绍了德国 H&B 公司 Advance Optima 模块化分析系统的新技术。论述了其标准化设计, 新型传感器技术, 微机技术及仪器整体化设计思路。

**关键词** 模块化分析仪 多组分气体测量 分析系统

德国 H&B 公司的模块化 Advance Optima 分析系统配备了 6 种不同原理的分析模块, 可随意组合, 与共用的中心电子单元配合, 能组成多功能的过程分析仪器, 实现多种气体的同时分析, 具有新颖而先进的整体构思。

### 1 标准化设计

#### 1.1 总体结构

与单台、单原理气体分析仪不同的是, Advance Optima 分析系统配备了 6 种不同原理的标准分析模块, 中心电子单元的一个电子模块及一个显示单元。电子模块带有系统控制器, 可随意挂接 6 种分析模块。一个 Advance Optima 系统最多可同时挂三个分析模块。最简单的系统可由一个中心电子单元和一个分析模块构成。

分析系统由以下单元组成:

(1) 中心电子单元, 包括电子模块及显示单元。

(2) Uras 14 红外线分析模块。

(3) Magnos 16/Magnos 17 磁氧分析模块。

(4) Caldos 15/Caldos 17 热导式分析模块。

(5) Multi-FID 14 碳氢化合物总量分析模块。

分析系统在结构上采用标准化设计, 电子模块及 6 种分析模块的机械结构、尺寸、气路

接口、电气接口非常统一, 很容易进行维护和互换。

#### 1.2 机箱

在实际应用时, 分析模块和电子单元应安装在专门配制的机箱内。机箱有普通机箱和两种防爆机箱供选用。普通机箱有嵌入式和壁挂式两种, 每种机箱均可装入两个标准模块。中心电子单元的电子模块与显示单元可分开安放, 只占一个模块的位置。防爆机箱按北美标准和欧洲标准设计, 有用于 2 区防爆场所及 1 区防爆场所的两类机箱。用于 2 区的也有嵌入式和壁挂式两种, 每种机箱可装两个模块。用于 1 区时, 中心电子单元及分析模块均为专用机箱。中心单元为带吹扫的正压机箱, 可配吹扫气体监控单元; 分析模块则是专用的隔爆机箱。隔爆机箱只能装一个分析模块, 目前只有 Uras 14、Magnos 16、Caldos 15、Caldos 17 可装入这种隔爆机箱。

#### 1.3 分析模块

红外分析原理的 Uras 14 模块为双光路设计, 集成了原 Uras 的自动校准技术、滤光片制造技术及抗干扰技术。每个光路最多可分析两个组分。该模块最多可测定 4 个组分。模块用电加热进行恒温, 以保证测量的稳定性。根据不同的应用, 有普通镀金气室和参比气室供选择。